

11. Alberto MONROY. — **Ricerche sul significato fisiologico della capsula dell'uovo degli Echinodermi.**

Riassunto. — La capsula dell'uovo di riccio di mare è una glicoproteina solforata. Essa è stata ottenuta anche in forma di fibrille microscopiche birifrangenti. Si dimostra che gli ioni inorganici non intervengono nel mantenere l'architettura molecolare della capsula. Nella interazione tra spermi e sostanza della capsula si ha depolimerizzazione di questa e i frammenti si attaccano alla superficie degli spermi. In questa reazione intervengono i gruppi —NH_2 alla superficie degli spermi e i gruppi —SO_3 della sostanza della capsula. Non sembra che queste reazioni siano di natura enzimatica.

Résumé. La capsule de l'oeuf d'oursin est une glycoprotéine sulfurée que on est réussi à obtenir en fibrilles microscopiques birefrangentes. Les ions inorganiques ne jouent aucun rôle dans le maintien de l'architecture moléculaire de la capsule. Lors de l'interaction entre les spermes et la substance de la capsule a lieu une dépolymérisation de cette-ci et les fragments s'attachent à la surface des spermes. Dans la formation de ces liaisons interviennent les groupements —NH_2 à la surface des spermes et —SO_3 de la substance de la capsule. Toutes ces réactions ne sont pas enzymatiques. La signification physiologique de ces réactions est discutée.

Summary. The jelly-coat of the sea urchin egg is a glycoprotein with a high content of —SO_3 groups. It has been obtained as microscopic birefringent fibrils. Inorganic ions do not appear to play any role in the molecular architecture of the coat. In the interaction between sperm and jelly-coat substance depolymerization of the latter occurs and the fragments become bound to the surface of the sperm. Such binding appears to take place through the —NH_2 groups at the surface of the sperm and the —SO_3 groups of the substance of the jelly. The results of the experiments disprove the enzymatic nature of such reactions. Their possible physiological significance is discussed.

Zusammenfassung. — Die Hülle der Seeigeleier besteht aus einem schwefelhaltigem Glykoprotein welches auch in Form von mikroskopischen Fasern erhalten wurde. Es wird bewiesen, dass die anorganischen Ionen nicht zur Aufrechterhaltung der molekularen Struktur der Hülle beitragen. Spermatozoen und Hülle wirken gegenseitig auf einander.

wobei die Hüll einer Depolymerisierung unterliegt; ihre Bruchteile bleiben dann an der Oberfläche der Spermatozoen haften. In dieser Reaktion nehmen an der Oberfläche der Spermatozoen NH_2 -Gruppen und in der Hüllensubstanz SO_3 -Gruppen teil. Diese Reaktionen scheinen nicht enzymatischer Natur zu sein.

In questo articolo saranno riassunti i risultati che nel corso di questi ultimi anni si sono ottenuti nel nostro Laboratorio sul problema del significato fisiologico della capsula dell'uovo di riccio di mare, coordinandoli con quelli che parallelamente sono stati ottenuti in altri Laboratori.

L'uovo di riccio di mare, come quello della maggior parte degli animali, è avvolto da una capsula che nel caso specifico è costituita da una glicoproteina solforata. Nei generi Europei ed Americani studiati finora si è trovato che ogni genere ha una costituzione tipica per quanto riguarda i carboidrati che entrano nella composizione della sostanza della capsula. Così in *Echinus esculentus* si è trovato solo galattosio ⁽¹⁾, in *Echinochardium cordatum* solo fucoso ⁽²⁾, in *Strongylocentrotus droebachiensis* si ha fucoso e galattosio ⁽³⁾, in *Paracentrotus lividus* si ha fucoso e glucoso ⁽²⁾, in *Arbacia lixula*, fucoso, galattosio e tracce di mannoso ⁽³⁾, in *Echinarachnius parma* solo fruttosio ⁽⁴⁾. In nessun caso si sono trovati amminozuccheri. In tre generi Giapponesi però (*Hemicentrotus pulcherrimus*, *Pseudocentrotus depressus* e *Helicidaris crassispina*) si è trovato come unico componente il fucoso ⁽⁵⁾. E' probabile dunque che la specificità zoologica della sostanza della capsula abbia un substrato chimico più fine. Secondo lo schema di VASSEUR ⁽¹⁾ i residui di carboidrati sarebbero esterificati con acido solforico. Il contenuto in S varia nei diversi generi e può raggiungere valori elevati fino al 33% (calcolato come $-\text{SO}_4$, in *Echinus esculentus*). Per quanto riguarda invece la componente proteica, che rappresenta circa il 25 % della sostanza della capsula, mancano precise determinazioni quantitative. Come per tutte le glicoproteine, ben poco si conosce dei rapporti reciproci tra carboidrati e parte proteica. Tutti i tentativi fatti per distaccare le due parti non hanno finora approdato ad alcun risultato. Nei tentativi di frazionamento le frazioni che si sono ottenute erano del tutto indistinguibili le une dalle altre sia dal punto di vista fisiologico che da quello della composizione in carboidrati. Alcune esperienze ancora in corso nel nostro Laboratorio indicherebbero però che con particolari metodi è possibile arrivare alla separazione di due componenti diversi.

Alla analisi elettroforetica il materiale della capsula mostra una componente unica con migrazione anodica anche a pH 2,0 ⁽⁶⁾. Anche una componente unica si osserva alla ultracentrifuga con S_{20} di 6.3×10^{-13} che, per molecole sferiche, corrisponderebbe ad un peso molecolare di circa 82.000 ⁽⁶⁾. Data però la elevata viscosità e la birifrangenza da scorrimento delle soluzioni di sostanza della capsula che indicano una forte asimmetria molecolare, i dati della sedimentazione appaiono alquanto dubbi.

Con particolari accorgimenti tecnici noi siamo adesso riusciti ad ottenere la sostanza della capsula in forma di esilissime fibrille dotate di birifrangenza positiva rispetto all'asse longitudinale ⁽⁷⁾. Col metodo delle imbibizioni ⁽⁸⁾ le fibrille mostrano una associazione di birifrangenza propria e birifrangenza per forma. Evidentemente quindi le fibrille microscopicamente visibili risultano formate da micelle cristalline (birifrangenza propria) associate in fasci a formare le fibrille visibili al microscopio (birifrangenza per forma). Nella capsula in vivo è difficile dire quale possa essere l'orientamento delle micelle né i dati della letteratura permettono di formulare alcuna ipotesi. Le osservazioni sulla birifrangenza indotta nella sostanza della capsula dopo colorazione con blu di toluidina fanno pensare che le molecole del colore si orientino tangenzialmente. Ma anche in base a questa osservazione è difficile dire quale possa essere l'orientamento delle molecole della sostanza della capsula fino a quando non si abbiano dati più precisi circa il modo con cui le molecole del colore si legano a quelle della sostanza della capsula ⁽⁹⁾.

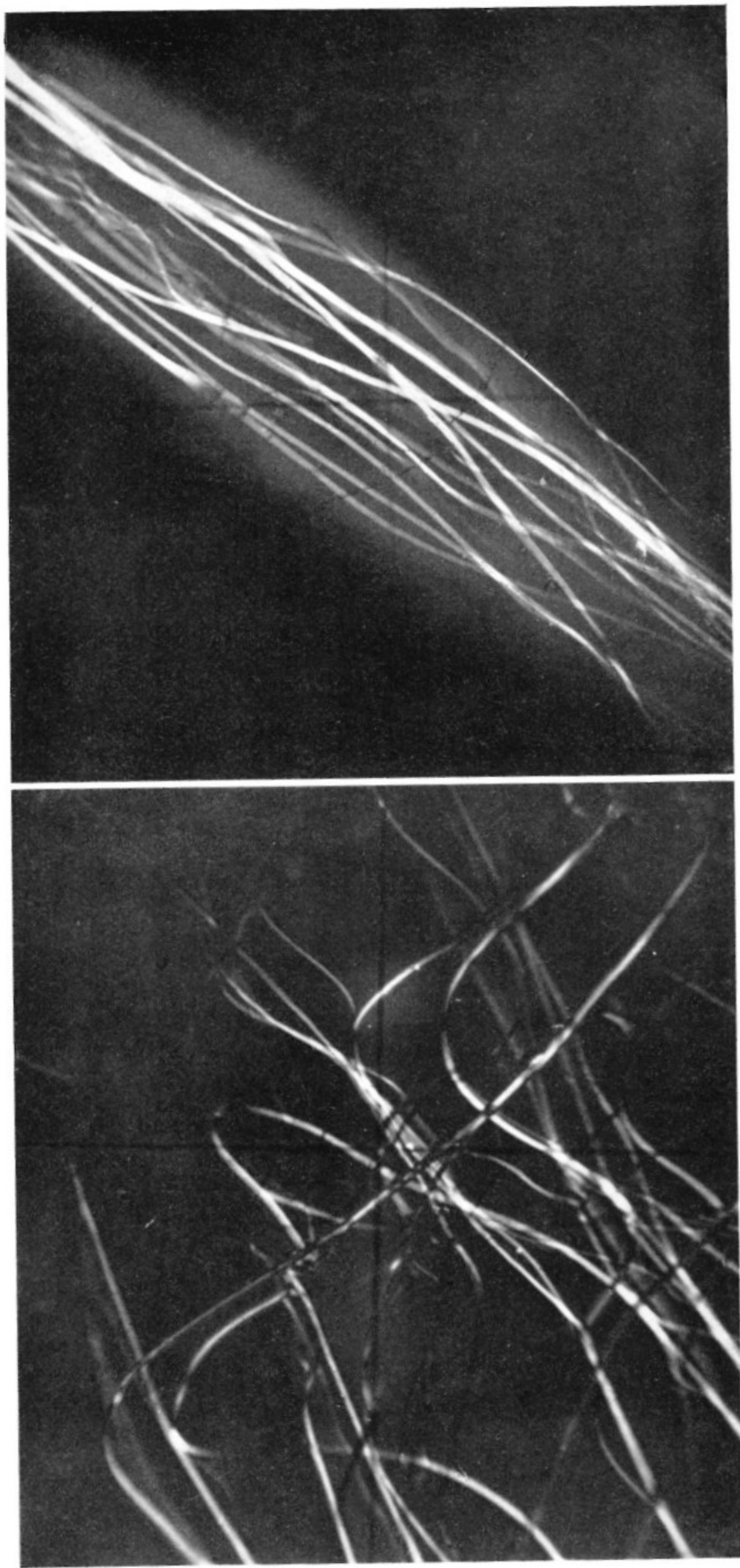
Secondo VASSEUR ⁽¹⁰⁾ una parte importante nel mantenimento della architettura molecolare della sostanza della capsula spetterebbe agli ioni Ca in quanto le molecole polisaccaridiche sarebbero tenute assieme da ponti formati da ioni Ca. Le nostre osservazioni però non si accorderebbero con questa interpretazione ⁽¹¹⁾. Infatti l'aggiunta anche di piccole quantità di Ca ad una soluzione viscosa di sostanza della capsula disciolta in acqua distillata, determina una considerevole caduta della viscosità. Effetti ancora più notevoli si ottengono, come era da attendersi, per aggiunta di NaCl e di acqua di mare. Ora poichè la capsula in vivo è molto compatta e viscosa, queste osservazioni fanno dubitare che gli ioni inorganici, ed il Ca in particolare, possano in qualche modo intervenire nel mantenimento della architettura molecolare di essa. Ancora più indicative sono altre osservazioni sulle proprietà metacromatiche della capsula. La capsula dell'uovo di riccio infatti si colora metacromaticamente in modo intenso con il blu di toluidina ed in modo più debole con il blu di metilene. Ora le soluzioni di sostanza della cap-

sula in acqua distillata mantengono questa proprietà mentre la perdono in acqua di mare ⁽¹¹⁾. Nel campo dei polisaccaridi solforati questo non è un fatto nuovo in quanto è noto ⁽¹²⁾ che la reazione metacromatica è ridotta o abolita dai sali. Tutto ciò dunque porterebbe alla conclusione che in vivo la capsula è priva di sali ⁽¹¹⁾. Quando le uova di riccio vengono lasciate in acqua di mare per qualche tempo la sostanza della capsula va lentamente in soluzione, il che potrebbe essere dovuto all'azione fluidificante degli ioni dell'acqua di mare. La mancanza di sali nella capsula potrebbe essere di notevole importanza fisiologica in quanto si verrebbe così a costituire una barriera tra due mezzi a diverso contenuto salino, l'uovo e l'acqua di mare circostante.

Molte ricerche sono state dedicate al problema del significato fisiologico della capsula dell'uovo. E' stato merito di F. R. LILLIE ^(13, 14) di avere attirato l'attenzione sul possibile ruolo della capsula nel processo della fecondazione. LILLIE infatti osservò che soluzioni di sostanza della capsula hanno la proprietà di agglutinare gli spermatozoi della stessa specie, di attivarli e di esercitare su di essi un'azione chemiotattica. Mentre si può oggi del tutto escludere una attività chemiotattica della sostanza della capsula e il significato della seconda è discutibile ^(10, 15), la reazione di agglutinazione è molto importante per la interpretazione della interazione tra sostanza della capsula e spermatozoi. Al componente attivo della sostanza della capsula LILLIE dette il nome di *fertilizina* con questo nome volendo significare che secondo la sua concezione essa giuocava un ruolo fondamentale nel meccanismo della fecondazione. Lillie riteneva anche che la fertilizina venisse continuamente prodotta dall'uovo vergine mentre la neoformazione di essa si arrestava una volta avvenuta la fecondazione. Ciò si è dimostrato inesatto ⁽⁶⁾.

E' un fatto che prima di giungere a contatto con la superficie dell'uovo e quindi penetrare all'interno di esso, lo spermio deve attraversare la capsula. Le uova private di capsula (sebbene ciò non sia possibile in modo completo in quanto è molto probabile che uno straterello di essa rimanga sempre aderente alla membrana vitellina dell'uovo) sono difficilmente fecondabili. Ciò dimostra che la capsula compie una effettiva funzione importante nella fecondazione. LILLIE diceva infatti che per il successo della fecondazione lo spermio deve anche a sua volta essere fecondato, ciò che avverrebbe nel passaggio attraverso la capsula. Poco dopo avvenuta la fecondazione la capsula si discioglie.

Alcuni anni or sono fu scoperto che lo sperma dei Mammiferi possiede un enzima che opera la depolimerizzazione del mucopolisaccaride che tiene unite le cellule della teca e si ritenne che esso fosse il fattore responsabile della penetrazione dello spermio fino all'uovo ^(16, 17). Anche



Fibrille della sostanza della capsula dell'uovo di *Arbacia lixula*, in luce polarizzata.

in estratti di sperma di riccio si trovò un fattore enzimatico, ad attività invero piuttosto debole, capace di operare una certa fluidificazione della sostanza della capsula (¹⁸, ¹⁹, ²⁰). Ciò fece pensare che anche in questi animali un meccanismo enzimatico simile a quello trovato nei Mammiferi, presiedesse alla penetrazione dello spermio fino all'uovo. Ricerche successive hanno però portato a modificare questa concezione. Si vide anzitutto che la cinetica della caduta della viscosità di una soluzione di sostanza della capsula alla quale siano aggiunti spermii vivi non è quella che ci si aspetterebbe se la reazione fosse di natura enzimatica (²¹). Non appena si aggiungono spermii ad una soluzione di sostanza della capsula si nota infatti una brusca caduta della viscosità che poi rimane invariata. Veniva inoltre dimostrato che spermii fissati possono ancora essere agglutinati da soluzioni di sostanza della capsula (²²) e noi abbiamo anche dimostrato che essi sono capaci di indurre un abbassamento della viscosità di una soluzione di sostanza della capsula del tutto identico a quello che si può ottenere con spermii vivi (²¹). Ciò prova in modo chiaro che la reazione di fluidificazione della sostanza della capsula ad opera degli spermii non è una reazione enzimatica. Veniva pertanto formulata l'ipotesi che nella reazione tra spermii e sostanza della capsula gruppi alla superficie dello spermio reagiscano con altri gruppi della sostanza della capsula per cui frammenti di questa si legherebbero alla superficie degli spermii (²¹). La agglutinazione degli spermii ad opera di soluzioni della sostanza della capsula (e cioè della fertilizina di LILLIE) sarebbe dovuta al fatto che due o più spermii sarebbero legati alla stessa particella di fertilizina (¹¹). D'altro canto il fatto che la alchilazione dei gruppi aminici liberi alla superficie degli spermii inibisce la agglutinazione (²²) suggeriva l'ipotesi che la reazione potesse svolgersi tra gruppi —NH_2 alla superficie dello spermio e gruppi —SO_3 della sostanza della capsula. Alcune esperienze sembrerebbero confermare questa ipotesi.

Si scoperse anzitutto che se si aggiungono spermii ad una soluzione di sostanza della capsula fino ad esaurimento dell'attività agglutinante della soluzione, dagli spermii agglutinati e lavati è possibile eluire il fattore agglutinante. Ciò dimostra che in realtà nella reazione tra spermii e sostanza della capsula particelle di questa si attaccano alla superficie degli spermii. Una più evidente dimostrazione di ciò fu data dallo studio delle variazioni quantitative del fucoso (che è il carboidrato componente principale della sostanza della capsula delle uova di *Arbacia lixula*) in seguito a reazione con gli spermii. Si vide così che in seguito a trattamento con spermii si ha una diminuzione del contenuto in fucoso della soluzione (¹¹). Indipendentemente da noi e quasi contemporaneamente questo risultato fu ottenuto da HULTIN et al. (²³). Una dimostrazione indi-

retta circa i gruppi che entrano in reazione fu data da esperimenti con un modello. Se una soluzione di sostanza della capsula viene trattata con una resina anionica (Amberlite IR 4B) si ha una rilevante caduta di viscosità, il suo titolo agglutinante si abbassa notevolmente e parallelamente si abbassa, fino alla scomparsa, il suo contenuto in fucoso. Dalla resina lavata si può eluire quantitativamente il fucoso perduto. In queste esperienze si osservò anche che mentre la resina trattiene il fucoso, o meglio la parte di glicoproteina che contiene il fucoso, il galattosio non viene trattenuto. Ciò potrebbe far pensare che i due carboidrati siano legati in modo diverso nella molecola della glicoproteina e confermerebbe l'ipotesi della presenza di due componenti nella sostanza della capsula ⁽¹¹⁾.

Queste esperienze mentre dimostrano che la reazione tra spermi e sostanza della capsula importa un legame tra gruppi dell'uno e dell'altra, non ci dicono se nella reazione non si abbia anche una depolimerizzazione della sostanza della capsula. Si potrebbe infatti pensare che la fluidificazione della sostanza della capsula ad opera degli spermi dipenda dal fatto che intere molecole di quella si attacchino alla superficie degli spermi e che quindi si abbia soltanto un effetto di diluizione. Alcune esperienze tenderebbero però a dimostrare che nella reazione avviene anche una frammentazione delle molecole della sostanza della capsula ⁽²⁴⁾.

Basandosi sulla osservazione che la metacromasia del blu di metilene in presenza di sostanza della capsula aumenta con l'aumentare della diluizione mentre è abolita dalla depolimerizzazione (ad es. per trattamento in autoclave a 110° C per 30 minuti) L. MESSINA ⁽²⁴⁾ ha eseguito esperimenti in cui veniva misurata quantitativamente la metacromasia di una soluzione di sostanza della capsula in presenza di blu di metilene dopo trattamento con spermi. E' stato possibile così dimostrare che gli spermi inducono anche una depolimerizzazione della sostanza della capsula. Queste esperienze dunque permettono di concludere che nella reazione tra spermi e capsula ovulare alla fecondazione si ha una depolimerizzazione delle molecole della sostanza della capsula e i frammenti si attaccano alla superficie degli spermi. Nel momento in cui lo spermio viene a contatto con la superficie dell'uovo si trova avvolto da un alone di particelle di sostanza della capsula. Questo materiale della capsula attaccato alla superficie dello spermio viene convogliato anche all'interno dell'uovo o lo spermio se ne libera prima di penetrare nell'uovo stesso? E' evidente che sarebbe molto importante per la fisiologia della fecondazione poter dare una risposta a questo quesito.

Secondo LILLIE (¹³, ¹⁴) le molecole di fertilizina potrebbero essere concepite come molecole bipolari, fornite cioè di un polo spermofilo e di uno ovofilo. LILLIE inoltre riteneva che la fertilizina oltre a essere un componente della sostanza della capsula entra anche nella costituzione dello strato corticale dell'uovo. Ora, secondo la teoria di LILLIE, lo spermio nel penetrare nell'uovo reagirebbe con le molecole di fertilizina localizzate nello strato corticale e questa prima reazione ne scatenerebbe altre in serie per cui tutte le altre molecole di fertilizina dello strato corticale verrebbero « attivate ». In seguito a ciò il polo ovofilo di tutte le molecole di fertilizina si legherebbe con una ipotetica sostanza contenuta nel citoplasma dell'uovo, il recettore ovulare (egg receptor) e questa costituirebbe la reazione chiave della attivazione dell'uovo. Il polo spermofilo delle stesse molecole di fertilizina d'altro canto reagirebbe con un'altra ipotetica sostanza citoplasmatica dell'uovo, l'antifertilizina, e questa reazione stabilirebbe il blocco contro la polispermia.

In realtà si è trovato nell'uovo un componente citoplasmatico che ha la proprietà di precipitare la sostanza della capsula ed esso si è voluto identificare con la antifertilizina di LILLIE (²⁵). Una parziale purificazione di questo componente citoplasmatico si è anche recentemente ottenuta (²⁶). Veniva d'altro canto fatta la constatazione che in questa reazione non intervengono fattori di specificità zoologica (²⁷) e che esso può essere estratto anche da uova fecondate: e ciò è contrario alla teoria di LILLIE. Poichè d'altro canto è noto che polisaccaridi solforati e glicoproteine hanno la capacità di formare complessi con proteine e soprattutto con nucleoproteine, non sembra giustificato il volere attribuire un particolare significato fisiologico a questa reazione (²⁸).

Queste ricerche dunque fanno vedere il significato fisiologico della capsula dell'uovo sotto una luce nuova in quanto dimostrano per la prima volta la natura della interazione tra spermatozoi e sostanza della capsula. Se si riuscisse a dimostrare che gli spermatozoi penetrano nell'uovo portando con sé il loro alone di molecole di sostanza della capsula, sarebbe necessario anche ammettere che queste molecole devono entrare in reazione con il citoplasma dell'uovo. Sebbene non si possa per il momento dire quale potrebbe essere il significato fisiologico di questa reazione nè la sua natura, è verosimile che essa, qualora avvenga, debba essere di notevole importanza per l'attivazione dell'uovo.

Roma — Istituto Superiore di Sanità.

Palermo — Istituto di Anatomia comparata « A. Giardina ».

BIBLIOGRAFIA

- (¹) VASSEUR E. - Acta Chim. Scand., 4: 1144 (1950).
 - (²) VASSEUR E. & IMMERS J. - Ark. f. Kemi, 1: 39 (1949).
 - (³) MINGANTI A. - Comunicazione personale.
 - (⁴) BISHOP D. W. & METZ Ch. B. - Nature, 169: 548 (1952).
 - (⁵) NAKANO E. & OHASHI N. - Embryologia, 2: 119 (1954).
 - (⁶) TYLER A. - The Amer. Natur., 83: 195 (1949).
 - (⁷) MONROY A. - In corso di stampa.
 - (⁸) AMBRONN H. & FREY A. - Das Polarisationsmikrop. Akad. Verlag, 1926.
 - (⁹) MITCHISON J. M. & SWANN M. M. - J. Exp. Biol., 29: 357 (1952).
 - (¹⁰) VASSEUR E. - Ark. f. Kemi, 1: 105 e ibid. 393 (1949).
 - (¹¹) MONROY A., TOSI L., GIRDINA G. & MAGGIO R. - Biol. Bull., 106: 169 (1954).
 - (¹²) LEVINE A. & SCHUBERT M. - J. Am. Chem. Soc., 74: 91 (1952).
 - (¹³) LILLIE F. R. - J. Exp. Zool., 16: 523 (1914).
 - (¹⁴) LILLIE F. R. - Problems of fertilization. Chicago Univ. Press, 1919.
 - (¹⁵) BIELIG A. J. & DOHRN P. - Ztsch. f. Naturforschung, 5b: 316 (1950).
 - (¹⁶) FEKETE E. & DURAN-REYNALS F. - Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med., 52: 119 (1942).
 - (¹⁷) MCCLEAN D. & ROWLANDS I. W. - Nature, 150: 627 (1942).
 - (¹⁸) LUNDBLAD G. & MONROY A. - Ark. f. Kemi, 2: 343 (1950).
 - (¹⁹) MONROY A. & RUFFO A. - Nature, 159: 603 (1947).
 - (²⁰) VASSEUR E. - Exp. Cell Res., 2: 144 (1951).
 - (²¹) MONROY A. & TOSI L. - Exp., 8: 393 (1952).
 - (²²) METZ Ch. B. & DONOVAN J. - Biol. Bull., 101: 202 (1951).
 - (²³) HULTIN E., KRISZAT G., LINDVALL S., LUNDBLAD G., LÖW H., RUNNSTRÖM J., VASSEUR E. & WICKLUND E. - Ark. f. Kemi, 5: 83 (1952).
 - (²⁴) MESSINA L. - Pubbl. Staz. Zool. Napoli (in corso di stampa).
 - (²⁵) RUNNSTRÖM J. - Biol. Bull., 68: 327 (1935).
 - (²⁶) MONROY A. & RUNNSTÖM J. - Exp. Cell Res., 3: 10 (1952).
 - (²⁷) DOHRN P. & MONROY A. - Exper., 8: 189 (1952).
 - (²⁸) MONROY A. - Proc. Sympos. « Biochemical and Structural basis of Morphogeneis » in Arch. Néerl. de Zool., 10: 18 (1953).
 - (²⁹) MONNÉ L. & SLAUTTERBACK D. B. - Exp. Cell Res., 1: 477 (1950).
 - (³⁰) RUNNSTRÖM J., TISELIUS A. & VASSEUR E. - Ark. f. Kemi, 15: 16 (1942).
 - (³¹) RUNNSTRÖM J. & MONROY A. - Ark. f. Kemi, 2: 405 (1950).
 - (³²) RUNNSTRÖM J. - The Harvey Lectures, Ser., 46: 116 (1950-51).
 - (³³) TYLER A. - Biol. Bull., 104: 224 (1953).
 - (³⁴) VASSEUR E. - Ark. f. Kemi, 25B: 6 (1947).
 - (³⁵) VASSEUR E. - Acta Chim. Scand., 2: 900 (1948).
-